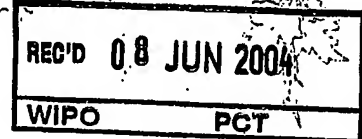


RO/KR 24. 05. 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.



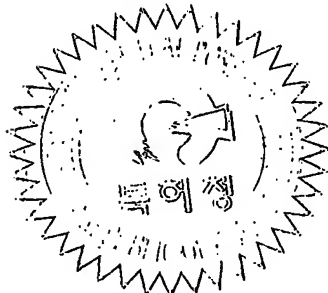
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0051593
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 07월 25일
Date of Application JUL 25, 2003

출원 인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.

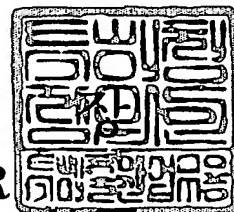
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2004 년 05 월 24 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.07.25
【발명의 명칭】	신규한 칸디다 트로피칼리스 씨제이-에프아이드 균주와 이를 이용한 자일리톨의 생산방법
【발명의 영문명칭】	Novel Candida tropicalis CJ-FID(KCTC 10457BP) and Manufacturing Method of Xylitol thereby
【출원인】	
【명칭】	씨제이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	조인제
【대리인코드】	9-1999-000606-6
【포괄위임등록번호】	2000-035353-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정훈
【성명의 영문표기】	KIM, Jung Hoon
【주민등록번호】	711020-1227116
【우편번호】	152-763
【주소】	서울특별시 구로구 구로1동 구일우성아파트 205-2001
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손영록
【성명의 영문표기】	SOHN, Young Rok
【주민등록번호】	540925-1695817
【우편번호】	138-050
【주소】	서울특별시 송파구 방이동 올림픽선수촌아파트 251-601
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이운화
【성명의 영문표기】	LEE, Woon Hwa
【주민등록번호】	720824-1037911

【우편번호】 431-080
【주소】 경기도 안양시 동안구 호계동 한마음임광2차아파트 203-704
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 박승원
【성명의 영문표기】 PARK, Seung Won
【주민등록번호】 670831-1683114
【우편번호】 449-840
【주소】 경기도 용인시 수지읍 풍덕천2동 1168번지 진산마을삼성5차아파트 50 1-1203
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 박강준
【성명의 영문표기】 PARK, Kang June
【주민등록번호】 591027-1665514
【우편번호】 406-130
【주소】 인천광역시 연수구 동춘동 대우3차아파트 109-201
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이기창
【성명의 영문표기】 LEE, Ki Chang
【주민등록번호】 560101-1149813
【우편번호】 402-080
【주소】 인천광역시 남구 관교동 13-9 성지아파트 102-406
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 임재각
【성명의 영문표기】 LIM, Jae Kag
【주민등록번호】 560401-1036129
【우편번호】 137-040
【주소】 서울특별시 서초구 반포동 18-1 주공아파트 230-202
【국적】 KR
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 1

【서열목록의 전자파일】	첨부		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인		
	조인제 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	14 면	29,000 원	
【가산출원료】	0 면	0 원	
【우선권주장료】	0 건	0 원	
【심사청구료】	0 항	0 원	
【합계】	29,000 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 별꼴로부터 분리한 신규한 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) CJ-FID(KCTC 10457BP)와 이를 이용한 자일리톨의 생산방법에 관한 것으로, 자일로스와 설탕을 함유하는 발효배지에 상기 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC 10457BP)를 접종하는 접종단계; 및 상기 접종된 배지를 발효조에서 발효하는 발효단계를 포함하여 이루어지며, 본 발명에 의한 자일리톨의 생산방법에 의하여 고수율과 고생산성의 자일리톨을 제조할 수 있는 효과가 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

자일리톨, 칸디다 트로피칼리스, 배양조건, 배지조성, 발효

【명세서】

【발명의 명칭】

신규한 칸디다 트로피칼리스 씨제이-에프아이드 균주와 이를 이용한 자일리톨의 생산방법
 {Novel Candida tropicalis CJ-FID(KCTC 10457BP) and Manufacturing Method of Xylitol
 thereby}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 초기 자일로스 농도에 따른 자일리톨의 생산정도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 초기 균체 농도에 따른 자일리톨의 생산정도를 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<3> 본 발명은 신규한 균주인 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) CJ-FID 및 이를 이용한 자일리톨의 생산방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 상기 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID를 설당을 함유하는 발효 배지에서 배양하여 자일로스로부터 고농도, 고수율 및 고생산성의 자일리톨을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<4> 자일리톨은 오탄당인 자일로스(xylose)의 환원성 말단기에 수소가 첨가되어 알콜기로 환원된 당알콜로서 자연계의 과일, 채소 및 버섯 등의 식물체에 소량 존재하고 또한 포유동물 탄수화물 대사의 중간산물로 알려져 있다. 자일리톨은 화학 구조상의 특징으로 인하여 다른 당류에 비하여 안정성이 높으며, 물과의 친화력이 높고, 갈색화 반응을 일으키지 않는다.

- <5> 또한, 자일리톨은 설탕과 같은 감미도를 가지면서 설탕보다 낮은 칼로리를 가지고 있어 설탕 대체 감미료로 사용된다. 특히, 당뇨병 환자가 자일리톨을 세포 조직 속으로 흡수시 인슐린을 필요로 하지 않아 당뇨병 환자를 위한 대용당으로 사용되고 있다.
- <6> 또한, 자일리톨은 용해시 열감소가 일어나는 특성으로 인해 입안에서 느끼는 청량감이 커 식품의 여러분야에서 감미료로 응용되고 있으며, 충치발생과 관련된 스트렙토뮤탄스의 생육을 저해하여 충치 발생을 억제하는 효과가 있어 치약 등에도 사용되고 있다.
- <7> 자일리톨은 채소나 과일 등에 존재하기는 하나, 그 양이 미량이어서 이를 자연적으로 분리하는 것이 경제적이지 못한 문제점이 있었다. 기존의 자일리톨을 생산하는 방법으로는 화학적 방법 및 미생물을 이용한 방법이 공지되어 있다.
- <8> 화학적으로 생산하는 방법으로는 자일로스를 환원시키는 것이다. 그러나 이 방법은 원료인 자일로스가 고순도로 정제된 것이어야 하고, 반응 후 화학 반응액에 혼합되어 있는 자일로스와 자일리톨의 물리화학적 특성이 유사하여 별도의 까다로운 분리공정이 필요한 문제점이 있다. 또한, 알칼리를 이용한 고온, 고압의 반응인 바, 위험성과 폐기물 처리의 문제점이 있었다.
- <9> 다른 방법으로 미생물을 이용하는 것은, 미생물을 촉매처럼 사용하여 배지 중의 자일로스를 자일리톨로 생물전환시키는 것이다. 즉, 배지로부터 세포막을 통과해 세포내로 수송된 자일로스가 NADPH를 조효소로 사용하는 자일로스 환원효소(XR)에 의해 자일리톨로 전환되고, 이 자일리톨이 세포내에 과량 축적된 후 세포밖으로 배출되는 것이다.

<10> 상기 미생물에 의한 방법은 반응 후 자일로스의 완전 소모로 인해 자일로스와 자일리톨의 분리공정이 필요하지 않으며, 상온 및 상압의 온건한 반응 조건 등의 장점이 있으나, 자일리톨의 생산 수율이 낮은 문제점이 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은, 고농도의 자일리톨을 생산하는 신규한 칸디다 트로피칼리스 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<12> 또한, 본 발명은 상기 균주를 이용하여 고농도, 고수율 및 고생산성의 자일리톨의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<13> 본 발명의 상기 목적 및 기타 목적들은 하기 설명되는 본 발명에 의하여 모두 달성될 수 있다.

【발명의 구성】

<14> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,

<15> 신규한 칸디다 트로피칼리스 균주 CJ-FID(KCTC 10457BP)를 제공한다.

<16> 또한, 자일로스와 설탕을 함유하는 발효배지에 칸디다 트로피칼리스 균주를 접종하는 접종단계; 및 상기 접종된 배지를 발효조에서 발효하는 발효단계를 포함하여 이루어짐을 특징으로 하는 자일리톨의 생산방법을 제공한다.

<17> 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

- <18> 본 발명의 신규한 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) CJ-FID(KCTC 10457BP)는 천연벌꿀에서 분리된 균주로서, 종배양된 균주를 자일로스, 설탕 및 질소원을 함유하는 배지에서 배양하여 고농도의 자일리톨을 생산할 수 있다.
- <19> 본 발명의 신규한 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID균주는 하기의 방법에 의하여 분리하였다.
- <20> 자일리톨 생산 효모균주의 분리
- <21> 국내의 산지에서 채취된 벌꿀을 멸균된 튜브에 직접 시료를 채취하여 적당히 희석한 후, 자일로스 200 내지 400g/L, 효모추출물(yeast extract) 5g/L, 펩톤(peptone) 5g/L, 아가(agar) 15 내지 20g/L가 포함된 평판을 이용하여 30℃에서 배양한 후, 상기 조건에서 성장이 빠른 효모 균주들을 중심으로 단일 군락(single colony)을 선별하였다.
- <22> 자일리톨 생산 효모균주의 동정
- <23> 상기한 조건 하에서 내당성 및 자일리톨 생성능이 우수한 효모 균주를 선별하여, 이를 형태학적, 생리학적 특성을 기초로 하여 분류하고 26s rDNA의 염기서열 분석을 통하여 서열목록 1의 염기서열을 얻음으로써 최종적으로 동정하였으며, 동정된 균주를 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID라고 명명하고, 생명공학연구소 유전자은행에 수탁번호 KCTC 10457BP로 기탁하였다.
- <24> 자일리톨 생성능의 조사

<25> 선별한 효모 균주의 자일리톨 생성능을 조사하기 위하여 선별된 단일 균락을 자일로스 20g/L, 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L, 설탕 2g/L가 첨가된 배지 50mL이 들어있는 250 mL의 플라스크에 접종하여 진탕 배양기에서 200rpm, 30℃로 12시간 배양하였다. 이 후, 자일로스 100g/L, 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L, 설탕 10g/L가 첨가된 본 배양용 배지 100 mL이 들어있는 500mL의 플라스크에 5% 접종하여 진탕 배양기에서 150rpm, 30℃로 하여 42시간동안 배양하였다. 배양 후 일정한 시간 간격으로 배양액의 일부 시료를 채취한 후, 자일리톨의 생성 여부를 조사하였다.

<26> 자일로스 및 자일리톨의 분석

<27> 생성된 자일리톨 및 자일로스의 분석은 채취한 시료를 원심분리기를 이용하여 12,000rpm으로 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액만을 크로마실 100-10 NH₂ 칼럼(Kromasil, 덴마크)이 장착된 HPLC(Shimadzu, Japan)의 Refractive Index Detector(Shimadzu C-R6A, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 90% 아세토나이트릴(Acetonitrile)을 사용하였고, 유속은 2.0 mL/분 이었다. 균체농도는 탁도계를 이용하여 600nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

<28> 상기 얻어진 균주를 이용하여 자일리톨을 생산하는 방법은 다음과 같다.

<29> 효모추출물 0.1 내지 10 g/L, 펩톤 0.1 내지 10 g/L 및 설탕 0.1 내지 50 g/L를 함유하고 자일로스가 포함된 발효배지를 발효조에 투입한 후, 상기 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC

10457BP)를 접종하고 배양온도를 25 내지 35℃에서 발효조의 교반속도를 200 내지 300rpm으로 조절하여 발효를 수행한다.

<30> 상기 발효는 통기량이 0.5 내지 2vvm에서 이루어지며, 60 내지 100시간동안 발효를 시킨 후, 상기 배지를 원심분리하여 세포를 제거하고 상등액에서 자일리톨을 회수한다.

<31> 상기 배지에 투입되는 자일로스의 양은 50 내지 200 g/L가 바람직하며, 더욱 바람직하기로는 80 내지 150 g/L가 좋다. 만일 자일로스의 양이 50 g/L 미만인 경우에는, 자일리톨의 생산수율이 낮아지며, 200 g/L를 초과하는 경우에는 생산율이 더 이상 향상되지 않는다.

<32> 상기 배지에는 생산성을 증가시키기 위하여 인산화칼륨(KH_2PO_4) 0.1 내지 5 g/L, 황화마그네슘(MgSO_4) 0.5 내지 5 g/L가 추가될 수 있다.

<33> 이하 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 범위가 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<34> <실험예 1> 초기 자일로스 농도에 따른 자일리톨 생성능

<35> 상기한 바와 같이 종배양을 실시한 후, 자일리톨 생산을 위한 본 배양에서는 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L, 설탕 10 내지 30 g/L가 첨가된 배지에 자일로스를 100 내지 300 g/L로 변화시켜 첨가한 후, 배지부피가 10L 가 되도록하여 15L 발효조(한국발효기(주))를 사용하여 발효를 수행하였다. 발효과정 중에 교반속도는 250rpm으로 조절하였고 통기량은 1.0vvm, 배양온도는 30℃로 조절한 후, 초기 자일로스 농도에 따른 자일리톨 생성능을 조사하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- <36> 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 최대 자일리톨 생산량은 187 g/L였고, 생산수율은 93.5%로 상당히 우수하였고, 설탕을 첨가함으로써 자일리톨 생산 수율이 증가함을 알 수 있었다.
- <37>
- <38> <실험예 2> 초기 균체 농도에 따른 자일리톨 생성능
- <39> 상기한 바와 같이 종배양을 실시한 후, 자일리톨 생산을 위한 본 배양에서는 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L, 설탕 10g/L 및 자일로스 100g/L가 첨가된 배지부피가 10L가 되도록하여 15L 발효조(한국발효기(주))를 사용하여 발효를 수행하였다. 발효과정 중에 교반속도는 250rpm으로 조절하였고 통기량은 1.0vvm, 배양온도는 30℃로 조절한 후, 초기 균체 농도에 따른 자일리톨 생성능을 조사하고 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- <40> 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 최대 자일리톨 생산량은 132g/L였고, 사용된 자일로스 대비 자일리톨 생산 수율은 98%로 상당히 우수함을 알 수 있었으나, 고농도 자일로스로 인한 자일리톨 생산 속도가 저하됨을 확인하였다.
- <41> <실험예 3>기존의 자일리톨 생성균주와 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC 10457BP)의 내당성의 비교
- <42> 상기에서 얻어진 본 발명의 균주와 기존의 자일리톨 생성균주의 내당성을 비교하여 하기 표 1에 나타내었다.

<43> 【표 1】

기존 자일리톨 생산가능 효모균주와의 내당성 비교

효모균주	자일로스 농도(g/L)			
	100	200	300	400
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7101	+++	+++	+	-
디바리오미세스 한세니 KCTC 7128	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7212	+++	+++	-	-
칸디다 파랍실롭시스 KCTC 7653	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7725	+++	+++	+	-
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7901	+++	+++	-	-
칸디다 속 KCTC 17041	+++	+++	-	-
칸디다 세하타 KCCM 11895	+++	+++	+	-
칸디다 길리어폰디 KCCM 50050	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 KCCM 50091	+++	+++	+	-
칸디다 모기 KCCM 50199	+++	+++	-	-
칸디다 길리어폰디 KCCM 50631	+++	+++	-	-
칸디다 유틸리스 KCCM 50667	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 씨제이-에프아이디 KCTC 10457BP	+++	+++	++	+

<44> +++ : best growth, ++ : good growth, + : growth, - : no growth

<45> 상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 의한 신규한 칸디다 트로피칼리스

CJ-FID(KCTC 10457BP) 균주는 종래에 알려진 균주들에 비하여 높은 자일로스 농도에서도 내당성이 뛰어난 것을 알 수 있었으며, 이로 인하여 고농도 자일로스 배지에서 자일리톨의 대량 생산이 가능하게 되는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

- <46> 이상에서 설명한 바와 같이 본 발명에 의한 신규한 칸디다 트로피칼리스 균주 CJ-FID(KCTC 10457BP) 및 이에 의한 자일리톨의 생산방법은 각종 배양조건 및 배지조성을 최적화 함으로써 고수율, 고생산성의 자일리톨을 생산하는 방법을 제공하는 효과가 있는 유용한 발명인 것이다.
- <47> 상기에서 본 발명은 기재된 구체예를 중심으로 상세히 설명되었지만, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

자일리톨을 생산하는 것을 특징으로 하는 칸디다 트로피칼리스 균주 CJ-FID(KCTC 10457BP).

【청구항 2】

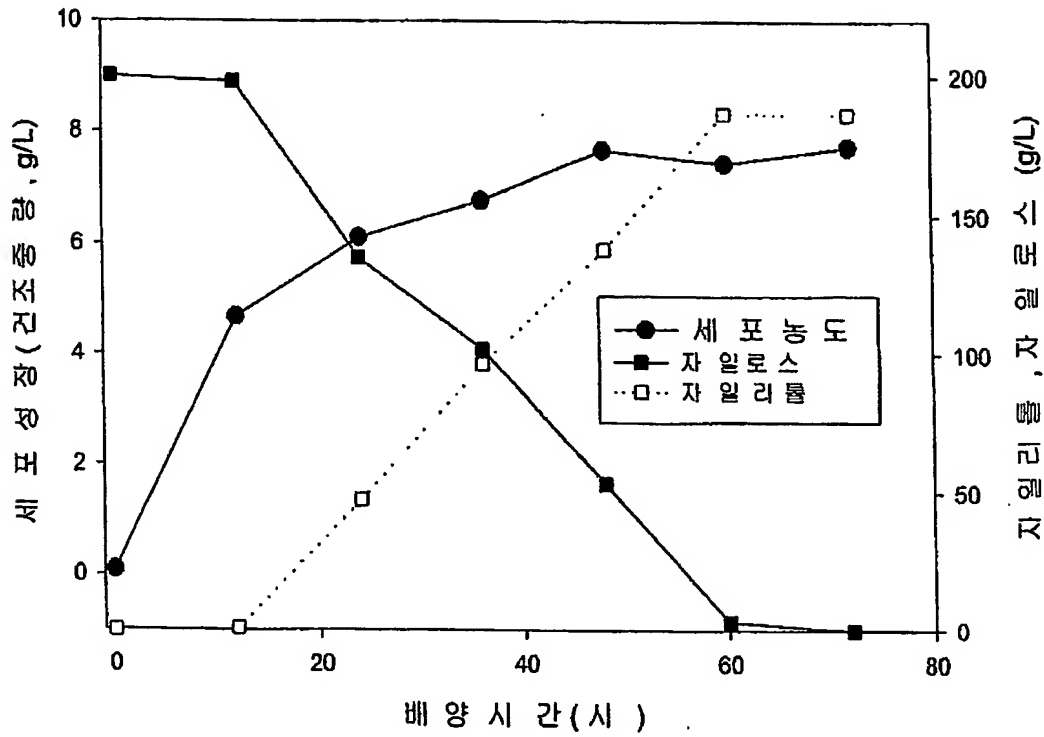
자일로스와 설탕을 함유하는 발효배지에 제 1 항의 칸디다 트로피칼리스 균주 CJ-FID(KCTC 10457BP)를 접종하는 접종단계; 및

상기 접종된 배지를 발효조에서 발효하는 발효단계;

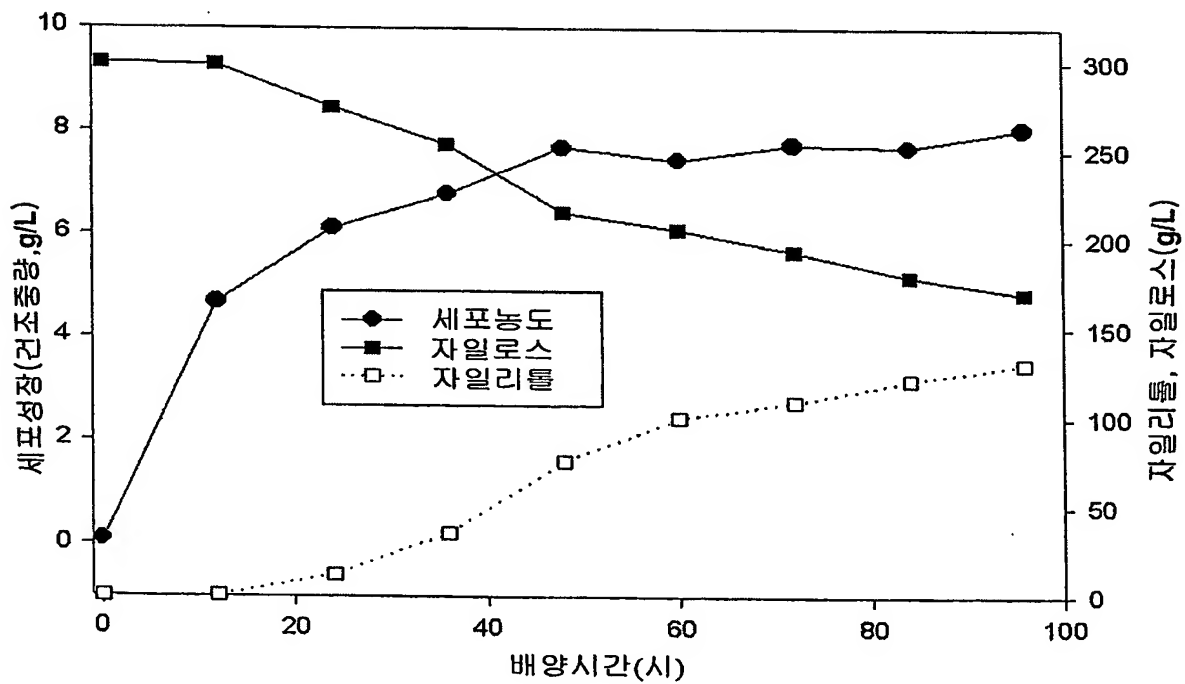
를 포함하여 이루어짐을 특징으로 하는 자일리톨의 생산방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【서열목록】

<110> CJ Corp. <120> Novel Candida tropicalis CJ-FID(KCTC 10457BP) and Manufacturing Method
of Xylitol thereby <130> PA03-0205 <160> 1 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 576 <212>
DNA <213> Candida tropicalis <400> 1 ataccaacag ggattgcctt agtagcggcg agtgaagcgg caaaagctca
aatttgaaat 60 ctggctcttt cagagtccga gttgtaattt gaagaaggta tctttgggtc tggctcttgt 120
ctatgtttct tggaacagaa cgtcacagag ggtgagaatc ccgtgcgatg agatgatcca 180 ggcctatgta aagttccttc
gaagagtcga gttgtttggg aatgcagctc taagtgggtg 240 gtaaattcca tctaaagcta aatattggcg agagaccgat
agcgaacaag tacagtgatg 300 gaaagatgaa aagaactttg aaaagagagt gaaaaagtac gtgaaattgt tgaaagggaa
360 gggcttgaga tcagacttgg tattttgtat gttacttctt cgggggtggc ctctacagtt 420 tatcgggcca gcatcagttt
gggcggtagg agaattgcgt tggaatgtgg cacggcttcg 480 gttgtgtgtt atagccttcg tcgatactgc cagcctagac
tgaggactgc ggtttatacc 540 taggatgttg gcataatgat ctttaagtcgc ccgtct
576